

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A23C 19/032, 19/076</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/27825 (43) Date de publication internationale: 2 juillet 1998 (02.07.98)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/EP97/06947 (22) Date de dépôt international: 28 novembre 1997 (28.11.97) (30) Données relatives à la priorité: 96203683.6 23 décembre 1996 (23.12.96) EP (34) Pays pour lesquels la demande régionale ou internationale a été déposée: AT etc. (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. [CH/CH]; Avenue Nestlé 55, P.O. Box 353, CH-1800 Vevey (CH). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PARMANTIER, Claude [FR/FR]; Les Plaines, F-14100 Glos (FR). DE-SACHY, Patrice [CH/CH]; Chemin du Fau-Blanc 2C, CH-1009 Pully (CH). (74) Mandataire: GROS, Florent; Avenue Nestlé 55, CH-1800 Vevey (CH).</p>		<p>(81) Etats désignés: AU, BR, CA, CN, ID, IL, JP, MX, NZ, PL, RU, SG, TR, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: FRESH CHEESE (54) Titre: FROMAGE FRAIS (57) Abstract <p>The invention concerns a method for preparing fresh cheese with a smooth texture and more than 13 % of dry matter, which consists in: fermenting milk with at least a strain of thermophilic lactic bacterium with short texture until a pH less than 4.9 is reached for obtaining curd, removing the resulting whey by continuous centrifuging at a rate higher than 500 l/h, never allowing the curd to be heated at more than 50 °C. The invention also concerns a non-refined cheese, obtainable by this method, having a smooth texture, and containing more than 13 % of dry matter and 10⁴-10¹⁰ cfu/g of short textured thermophilic lactic bacteria which, when fermenting pasteurised milk containing 10 % of skimmed powder milk, 1 % of yeast extract and 0.5 % of glucose, at 40 °C up to 4.9 pH, provide the medium with a viscosity which is less than 50 mPa.s at a shearing speed of 290 s⁻¹.</p><p>(57) Abrégé <p>Procédé de préparation d'un fromage frais ayant une texture lisse et plus de 13 % de matière sèche, dans lequel on fermente un lait par au moins une souche de bactérie lactique thermophile à texture courte jusqu'à atteindre un pH inférieur à 4,9 de sorte à obtenir un lait caillé, et on retire le lactosérum ainsi formé par centrifugation en continu à un débit supérieur à 500 l/h, le lait caillé n'étant jamais chauffé à plus de 50 °C. Fromage frais non-affiné, susceptible d'être obtenu selon le procédé de l'invention, ayant une texture lisse, et contenant plus de 13 % de matière sèche et 10⁴-10¹⁰ cfu/g de bactéries lactiques thermophiles à texture courte, c'est-à-dire des bactéries qui, lorsqu'elles fermentent un lait pasteurisé contenant 10 % d'une poudre de lait écrémé, 1 % d'extraits de levure et 0,5 % de glucose, à 40 °C jusqu'à pH 4,9, donnent une viscosité au milieu qui est inférieure à 50 mPa.s à une vitesse de cisaillement de 290 s⁻¹.</p></p></p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Fromage frais

La présente invention a pour objet un nouveau fromage frais contenant des bactéries lactiques thermophiles, ainsi qu'un procédé pour le préparer.

5

État de la technique

Les fromages frais non-affinés englobent de nombreux types de produits connus sous diverses dénominations selon les régions ou pays. Dans les pays anglo-saxons, il est de question de "quarg" ou de "cottage-cheese". En Allemagne, on utilise plutôt le nom de "quark". On connaît encore des fromages de ce type dans les pays scandinaves sous le nom de "viili". On rencontre aussi des produits analogues en Grèce ou dans les Balkans, ces produits étant notamment apparentés aux yoghourts égouttés.

15

Dans la fabrication traditionnelle de fromage frais, on inocule un lait pasteurisé avec une culture de bactéries lactiques mésophiles se développant de préférence à basse température, on ajoute éventuellement de la présure, et on incube le lait entre 18°C et 35°C pour obtenir un caillé essentiellement lactique baignant dans du lactosérum, c'est à dire un caillé ferme friable, poreux et peu contractile. Puis, on sépare le lactosérum par centrifugation, par ultrafiltration ou par égouttage au travers d'un filtre, et on récupère le caillé auquel on peut ajouter de la matière grasse et/ou des aromates (Veisseyre, Technologie du Lait, Ed. La Maison Rustique, Paris, pages 428-429, 604-609, 1975, I.S.B.N. 2-7066-0018-7).

25

Lors de la préparation d'un fromage frais, la séparation du lactosérum par centrifugation est conditionnée par l'existence d'un écart suffisant entre la densité du caillé et celle du lactosérum. De plus, la texture du caillé doit être telle qu'elle ne colle pas dans la centrifugeuse (Veisseyre, Technologie du Lait, Ed. La Maison Rustique, Paris, p.608, 1975, I.S.B.N. 2-7066-0018-7).

30

La thermo-sensibilité des protéines de lait peut être aussi mise à profit, avant de séparer le lactosérum, pour augmenter dans le caillé la teneur en matière sèche. Pour ce faire, le lait caillé acide obtenu après l'acidification lactique est simplement chauffé à 55-75°C durant quelques minutes, puis refroidi à environ 40°C. Ce traitement thermique permet en fait de modifier la structure des

35

particules de protéines formant le caillé, permettant ainsi une meilleure séparation du lactosérum (FR2361823; Tatini *et al.*, J. Dairy Science, 56, 815-825, 1971; A. Eck, Le Fromage, Ed. Lavoisier, Paris, pages 220-226, 1984, I.S.B.N. 2-85206218-6).

5

Ce traitement thermique pose cependant d'autres problèmes. En effet, le fromage frais ne contient quasiment plus de bactéries lactiques vivantes, ce qui pose ensuite des problèmes de stabilité face aux contaminants bactériens et fongiques. Pour pallier cet inconvénient, l'industrie fromagère généralement enrichit le fromage frais, dont le caillé a été chauffé, avec une culture fermentée de bactéries lactiques. A titre d'indication on peut citer les procédés décrits par FR2361823 (Westfalia), WO94/26124 (I.N.R.A.), EP196436 (S.P.N.), FR2342666 (Fanni *et al.*) et US4191782, par exemple.

15

A la lecture de la littérature, il est intéressant de remarquer que, dans la plupart des cas, l'industrie fromagère utilise uniquement des bactéries lactiques mésophiles pour la préparation d'un fromage frais centrifugé. Ces bactéries ont une croissance optimale à 18-35°C, elles sont rarement filantes ou très texturantes, et on dénombre parmi celles-ci les espèces *Leuconostoc citrovorum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus diacetylactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* et *Lactobacillus sake*, par exemple.

20

Quelques tentatives ont été faites pour fabriquer industriellement un fromage frais, qui est fermenté par des bactéries lactiques thermophiles, puis centrifugé. Ces bactéries lactiques ont une croissance optimale à 35-45°C, elles sont, le plus souvent, filantes et/ou texturantes, et on dénombre parmi celles-ci les espèces *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus helveticus*, par exemple. Malheureusement, comme illustré ci-après, l'utilisation industrielle de bactéries lactiques thermophiles pose des problèmes lors de la séparation du lactosérum par centrifugation, car la densité du caillé et celle du lactosérum ne présentent pas un écart suffisant, et/ou le caillé présente une texture collante (Veisseyre, Technologie du Lait, p.608). On perd ainsi une partie substantielle des solides du lait dans le lactosérum.

30

35

Par exemple, FR2354711 (Unilever) et EP144274 (J.-C. Pailler) proposent ainsi de premièrement concentrer un lait pasteurisé, puis deuxièmement de fermenter ce lait concentré par des bactéries lactiques thermophiles. Cependant cette base fromagère n'est pas satisfaisante du point de vue organoleptique.

5

De même, EP38940 (S.P.N.) propose un procédé de fabrication d'un fromage tartinable dans lequel, on forme un caillé par une coagulation avec des bactéries lactiques thermophiles en présence de présure, à un pH compris entre 5 et 5,3, et on égoutte le caillé par centrifugation. Malheureusement, si la coagulation intervient entre pH 5 et 5,3, et si l'on n'ajoute pas de sel, alors la texture obtenue est granuleuse.

10

V. M. Wolpert propose également un autre procédé dans lequel, on fermente un lait écrémé pasteurisé avec des bactéries lactiques thermophiles en présence de présure à 40°C jusqu'à pH 4,65, on laisse le lait caillé s'acidifier à 17°C pendant 16-18 h jusqu'à un pH de 4, on retire le lactosérum par centrifugation, on ultrafiltre le lactosérum pour récupérer les solides de lait qui n'avaient pas été précipités lors de la centrifugation, et on incorpore le rétentat dans le caillé de sorte à obtenir un fromage frais ayant une teneur standard en matière sèche (Milk Industry UK, 90, N°3, p.29, 1988).

15

20

On peut également remarquer les travaux de Shah *et al.* qui ont analysé l'effet de la présure sur la formation d'un caillé. Pour cela, ils ont fermenté un lait par des bactéries lactiques thermophiles jusqu'à un pH de 4,5 en présence de présure, puis ils ont précipité la plupart des solides de lait à l'aide d'une centrifugeuse de laboratoire fonctionnant à 2000 g pendant 10 min (J. Food Science, 55, 398-454, 1990). Le caillé ainsi obtenu présente cependant une texture très compacte, du fait de la centrifugation poussée des solides du lait, qui le distingue ainsi des fromages frais retrouvés dans le commerce ayant une texture lisse.

25

30

En conclusion, pour fabriquer industriellement un fromage frais ayant une teneur élevée en matière sèche, on recourt rarement à des bactéries lactiques thermophiles, sauf dans le cas où l'on ultrafiltre ou l'on égoutte simplement le caillé (voir J. L. Rasic, Cultures Dairy Products Journal, 22, p. 6-8, 1987; WO9514389; EP617899). En effet, la grande majorité des bactéries lactiques thermophiles donne un caillé qui se prête mal à une centrifugation industrielle, car

35

la quantité de solides de lait retrouvée dans le lactosérum dépasse les normes acceptables. Pour pallier cet inconvénient l'industrie fromagère recourt classiquement à une ultrafiltration du lactosérum, comme illustré ci-dessus par V. M. Wolpert, et/ou à un chauffage du lait caillé à 55-75°C, comme illustré ci-dessus par Tatini *et al.*.

Il n'a jamais été proposé d'utiliser une classe particulière de bactéries lactiques thermophiles pour résoudre ces problèmes, notamment des bactéries lactiques thermophiles à texture courte.

Bien que l'ensemble de la littérature ayant trait aux fromages frais contenant des bactéries lactiques thermophiles ne précise jamais s'il s'agit de bactéries à texture courte ou non, il y a très peu de chance que de telles bactéries aient déjà été utilisées pour préparer industriellement des fromages frais centrifugés. En-effet, la plupart des espèces de bactéries lactiques thermophiles présentent la propriété de donner une certaine viscosité à leur milieu de culture (voir EP750043; EP699689; EP97111381.6 et EP97111379.0). Pour chaque espèce, quelques souches sont cependant dénuées de cette propriété. Celles-ci sont appelées des bactéries à "texture courte".

La présente invention vise donc à utiliser avantageusement une classe mineure de bactéries lactiques thermophiles pour préparer un fromage frais ayant une teneur élevée en matière sèche.

Résumé de l'invention

A cet effet, l'invention a trait à un procédé de préparation d'un fromage frais ayant une texture lisse et plus de 13% de matière sèche, dans lequel on fermente un lait par au moins une souche de bactérie lactique thermophile à texture courte jusqu'à atteindre un pH inférieur à 4,9 de sorte à obtenir un lait caillé, et on retire le lactosérum ainsi formé par centrifugation en continu à un débit supérieur à 500 l/h, le lait caillé n'étant jamais chauffé à plus de 50°C.

L'invention concerne également un fromage frais non-affiné, susceptible d'être obtenu selon le procédé de l'invention, ayant une texture lisse, et contenant plus de 13% de matière sèche et 10^4 - 10^{10} cfu/g de bactéries lactiques thermophiles à

texture courte, c'est à dire des bactéries qui, lorsqu'elles fermentent un lait pasteurisé contenant 10% d'une poudre de lait écrémé, 1% d'extraits de levure et 0,5% de glucose, à 40°C jusqu'à pH 4,9, donnent une viscosité au milieu qui est inférieur à 50 mPa.s à une vitesse de cisaillement de 290 s⁻¹.

5

Description détaillée de l'invention

Contre toute attente, on a observé que l'on peut éviter de chauffer à 55-75°C un lait caillé avant d'en retirer le lactosérum. Les bactéries lactiques thermophiles à texture courte permettent d'obtenir un caillé, adapté à la centrifugation, présentant deux phases distinctes facilement séparables par centrifugation. En outre, le caillé n'encrasse pas la centrifugeuse.

On peut ainsi obtenir un fromage frais qui comprend tous les constituants majeurs du lait, ce qui donne un aliment particulièrement équilibré. En outre, ce fromage comprend des bactéries lactiques thermophiles vivantes. Il n'est donc pas indispensable d'enrichir ce fromage avec une culture de bactéries lactiques.

Par lait, on entend désigner, d'une part, un lait d'origine animal, tel que les laits de vache, de chèvre, de brebis, de bufflesse, de zébue, de jument, d'ânesse, de chamelle, etc. Ce lait peut être un lait à l'état natif, un lait reconstitué, un lait écrémé, ou un lait additionné de composés nécessaires à la croissance des bactéries, au traitement du lait, ou aux qualités finales du fromage frais, comme des matières grasses, de l'extrait de levure, de la peptone et/ou un surfactant, par exemple.

Le terme lait s'applique également à ce que l'on appelle communément un lait végétal, c'est à dire un extrait de matières végétales traitées ou non, telles que les légumineuses (soja, pois chiche, lentille, ect...) ou des oléagineuses (colza, soja, sésame, coton, etc...), extrait qui contient des protéines en solution ou en suspension colloïdale, coagulables par action chimique, par fermentation acide et/ou par la chaleur. Ces laits végétaux ont pu subir des traitements thermiques analogues à ceux des laits animaux. Ils ont pu subir également des traitements qui leur sont propres, tels que la décoloration, la désodorisation, et des traitements pour la suppression de goûts indésirables. Enfin, le mot lait désigne aussi des mélanges de laits animaux et de laits végétaux.

Ce lait doit être pasteurisé, c'est à dire doit avoir subi un traitement thermique et/ou par haute pression qui a inactivé tous les germes vivants. Ces techniques sont bien connues de l'homme du métier.

5

Le lait pasteurisé est ensuite inoculé avec un *inoculum* de bactéries lactiques thermophiles à texture courte. Bien que la littérature ayant trait aux bactéries lactiques thermophiles précise rarement s'il s'agit de bactéries à texture courte ou non, il y a très peu de chance que de telles bactéries soient des bactéries à texture courte. En-effet, la plupart des espèces de bactéries lactiques thermophiles présentent la propriété de donner une certaine viscosité à leur milieu de culture (voir EP750043; EP699689; EP97111381.6 et EP97111379.0). Pour chaque espèce, quelques souches sont cependant dénuées de cette propriété. L'homme du métier est à même de cribler parmi les espèces de bactéries lactiques thermophiles, celles qui sont à texture courte, notamment à l'aide des tests décrits ci-après, par exemple.

Cet *inoculum* peut être une culture en phase exponentielle de croissance, ajoutée au lait pasteurisé à raison de 1 à 5% en poids, par exemple. Elle peut être aussi une culture congelée ou séchée que l'on ajoute directement au lait à raison de 0,01 à 0,1% en poids, par exemple. Les techniques de préparation d'un *inoculum* bactérien sont bien connues de l'homme du métier. A titre d'indication, on peut citer les techniques décrites dans EP688864 (S.P.N.) et EP96201922.0 (S.P.N.)

On utilise au moins une souche de bactérie lactique thermophile à texture courte, c'est à dire une bactérie lactique, ayant une croissance optimale à 35-47°C, qui est capable de ne pas encrasser une centrifugeuse, lorsqu'elle est mise en œuvre dans le procédé selon l'invention.

D'une manière générale, ces bactéries sont non-filantes, Ces espèces n'ont donc pas le pouvoir de former une matière gluante dans différents milieux comme le lait et le sérum. Le caractère non-filant du lait fermenté par une bactérie thermophile à texture courte peut être observé et déterminé comme décrit ci-après.

1. Par observation de la structure du lait acidifié en comparaison de celle du lait acidifié avec des cultures non-filantes. Le lait non-filant adhère aux

parois d'un gobelet en verre, tandis que le lait filant est cohérent sur lui-même.

2. Un autre essai peut être effectué à la pipette. La pipette est trempée dans le lait acidifié qui est aspiré en quantité d'environ 2 ml, puis la pipette est retirée du lait. Le lait filant forme un fil entre la pipette et la surface liquide, tandis que le lait non-filant ne donne pas lieu à ce phénomène. Lorsque le liquide est relâché de la pipette, le lait non-filant forme des gouttes distinctes tout comme l'eau, alors que le lait filant forme des gouttes se terminant par de longs fils qui aboutissent au bec de la pipette.
3. Lorsqu'un tube à essai rempli à peu près jusqu'au tiers de sa hauteur est agité à l'aide d'un agitateur rotatif, le lait non-filant remonte sur la face intérieure de la paroi, alors que l'ascension du lait filant est pratiquement nulle.

Le caractère "texture courte" des bactéries lactiques thermophiles peut encore être déterminé à l'aide de paramètres de mesures rhéologiques. En effet, la texture d'un lait acidifié peut être caractérisée par sa viscosité. Quelques appareils commerciaux sont à même de déterminer ce paramètre, comme le rhéomètre Bohlin VOR (Bohlin GmbH, Allemagne). Conformément aux instructions du fournisseur, l'échantillon est placé entre un plateau et un cône tronqué de même diamètre (30 mm, angle de 5,4°, entrefer de 0,1 mm), puis l'échantillon est soumis à un gradient de vitesse de cisaillement rotatif continu qui le force à s'écouler. L'échantillon en résistant contre la déformation développe une force tangentielle appelée contrainte de cisaillement (shear stress). Cette contrainte qui est proportionnelle à la résistance à l'écoulement est mesurée par l'intermédiaire d'une barre de torsion. La viscosité de l'échantillon est alors déterminée, pour une vitesse de cisaillement donnée, par le rapport entre la contrainte de cisaillement (mPa) et la vitesse de cisaillement (s^{-1}).

Les nombreux essais de mesure rhéologique du caractère "texture courte" avec différentes souches thermophiles à texture courte, ont conduit à la définition suivante. Une bactérie lactique thermophile à texture courte peut être une bactérie thermophile qui lorsqu'elle fermente un milieu adapté à sa croissance à un pH

optimal pour la production d'une forte viscosité, donne une viscosité au milieu qui est inférieur à 50 mPa x seconde à une vitesse de cisaillement de l'ordre de 290 s⁻¹.

5 Plus particulièrement, ce sont des bactéries qui, lorsqu'elles fermentent un lait pasteurisé contenant 10% d'une poudre de lait écrémé, 1% d'extraits de levure et 0,5% de glucose, à 40°C jusqu'à pH 4,9, donnent une viscosité au milieu qui est inférieure à 50 mPa x s à une vitesse de cisaillement de 290 s⁻¹, par exemple.

10 Parmi les bactéries lactiques thermophiles à texture courte, les meilleurs résultats de mise en œuvre du présent procédé ont été obtenus avec la souche *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225. D'autres souches peuvent également être utilisées, notamment les souches *Lactobacillus bulgaricus* YS4 et YL8 mentionnées à l'exemple 3 ci-après.

15 Il faut noter que la souche *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 présente des avantages qui lui sont propres. C'est une bactérie lactique probiotique qui a déjà été décrite dans EP577904. L'invention se destine donc tout particulièrement à utiliser des bactéries lactiques thermophiles probiotiques à texture courte, c'est à dire les bactéries lactiques qui sont capables d'adhérer aux cellules intestinales
20 humaines, d'exclure des bactéries pathogènes sur des cellules intestinales humaines, et d'augmenter la propriété du corps humain à se défendre contre les pathogènes par exemple en augmentant les capacités de phagocytose des granulocytes issus du sang humain (J. of Dairy Science, 78, 491-197, 1995: capacité d'immunomodulation de la souche La-1 qui a été déposée à l'Institut
25 Pasteur sous le numéro CNCM I-1225).

On fermente ensuite le lait jusqu'à la formation d'un coagulum à un pH inférieur à 4,9. Cette fermentation vise à faire passer la caséine d'une phase colloïdale à une phase précipitée, ce passage s'accompagnant de la formation d'un liquide appelé
30 lactosérum ou petit-lait. Si le caillé est obtenu exclusivement par fermentation acide, il est préférable d'ajouter au lait, avant ou après pasteurisation, 50-300 ppm de chlorure de calcium de façon à assurer une contraction optimale du caillé, ce qui favorise d'autant par la suite la séparation du lactosérum.

35 La plupart du temps, on préfère obtenir un caillé par fermentation combinée à une action enzymatique. On peut donc ajouter au lait, après pasteurisation, 0,005 à

0,1% en volume/volume de présure. La présure est l'agent coagulant traditionnellement utilisé pour la coagulation du lait en vue de la fabrication de fromage. La dénomination "présure" est donnée à l'extrait coagulant provenant de caillettes de jeunes ruminants abattus avant sevrage. Elle contient en réalité deux fractions actives, l'une majeure constituée par la chymosine, et l'autre mineure par la pepsine.

Dans le cadre de la présente invention, on admettra que la présure englobe également les succédanés de présure de veau, comme les pepsines animales; les préparations coagulantes provenant du règne végétal extraites de l'artichaut, du chardon, de la ficine, du latex, du figuier, de la papaïne, par exemple; les préparations coagulantes provenant du règne microbien extraites des bactéries du genre *Bacillus* et *Pseudomonas*, et des moisissures appartenant aux espèces *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus* et *Mucor miehei*, par exemple.

La fermentation du lait peut aussi être conduite en présence de présure et de chlorure de calcium dans les proportions indiquées ci-dessus, par exemple.

On retire ensuite le lactosérum par une centrifugation industrielle en continu à un débit supérieure à 500 l/h, de préférence supérieure à 5000 l/h. L'homme du métier connaît bien les différents systèmes de centrifugation appliqués au lait caillé. A titre d'indication, on peut citer les appareils décrits dans FR2361823; A. Eck, Le Fromage, Ed Lavoisier, Paris, 1984, I.S.B.N. 2-85206218-6, page 220-226; et R. Veisseyre, Technologie du Lait, Ed. La Maison Rustique, Paris, 1975, I.S.B.N. 2-7066-0018-7, pages 604-609.

Pour mettre en œuvre la présente invention, le lait caillé n'est pas soumis à une température dépassant 50°C. Malgré cela, la perte en matière sèche dans le lactosérum est marginale. Le lactosérum, après centrifugation, contient en effet moins de 0,8% en poids de protéines, voire moins de 0,7%.

Dans une forme d'exécution particulière du procédé selon l'invention, après avoir séparé le lactosérum par centrifugation, on peut encore ajouter au caillé des arômes, des aromates, des épices et/ou des colorants, ou faire subir au caillé un foisonnement ou un ensemencement par des micro-organismes aptes à développer un arôme ou une consistance particulière, par exemple. En particulier, on mélange

le caillé à 10-60% en poids d'un lait fermenté par des bactéries lactiques et/ou à 0,1-15% en poids de crème de lait, par exemple.

5 Dans une autre forme d'exécution particulière du procédé selon l'invention, on fermente un lait écrémé pasteurisé par une bactérie lactique thermophile à texture courte à 35-47°C jusqu'à pH 4-4,9, en présence de présure et de 50-300 ppm de chlorure de calcium, et on sépare le lactosérum par centrifugation à 30-50°C.

10 L'invention permet d'obtenir un fromage frais non-affiné ayant au moins 13% de matière sèche, 10^4 - 10^{10} cfu/g de bactéries lactiques thermophiles à texture courte, et une consistance caractéristique de celle d'un fromage frais obtenu après centrifugation ou ultrafiltration d'un lait caillé par des bactéries lactiques mésophiles. Il a été observé qu'une teneur en matière sèche au moins supérieure à 13%, notamment 13-30%, donne un fromage lisse et onctueux qui se rapproche
15 d'une crème. Par contre, un fromage frais ayant moins de 13% en matière sèche est plutôt liquide, d'une consistance proche de celle d'un yogourt liquide.

Ce fromage frais peut comprendre jusqu'à 10^{10} cfu/g de bactéries lactiques thermophiles à texture courte. Cette caractéristique le différencie clairement des
20 fromages frais industriels obtenus après chauffage du caillé à 55-75°C comme décrit plus haut. En effet, il n'est pas possible d'atteindre une telle concentration en bactéries si l'on tente d'enrichir un fromage frais en bactéries lactiques, tout en respectant la valeur seuil de 13% en matière sèche.

25 Enfin, le fromage frais peut être aussi utilisé au cours de la fabrication d'une composition alimentaire plus complexe, notamment en tant que produit de fourrage, par exemple pour préparer des produits à base de céréales fourrés par du fromage frais selon l'invention. Le procédé décrit dans EP358983 (S.P.N.) est particulièrement indiqué pour préparer de tels produits, par exemple.

30 La présente invention est décrite plus en détail ci-après à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à un test de mesure de la viscosité d'un lait acidifié, et à des exemples de préparation de fromages frais. Les pourcentages et les parties sont donnés en poids sauf indication contraire. Il va de soi, toutefois,
35 que ces exemples sont donnés à titre d'illustration de l'objet de l'invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Test de mesure de la viscosité

5 On prépare un lait contenant 10% d'une poudre de lait écrémé, 1% d'extraits de levure et 0,5% de glucose, on le pasteurise à 95°C pendant 30 min, et on le fermente à 40°C avec une souche de bactérie lactique thermophile jusqu'à un pH de 4,9. On prélève 100 g d'échantillon dans un bécher, on le pré-cisaille à 300 tours/min pendant 60 secondes à l'aide d'un mélangeur (mélangeur Heidolph, Allemagne), on le conserve au réfrigérateur à 4°C pendant 1 heure, puis on le place à 15°C entre le plateau et le cône du rhéomètre Bohlin VOR (Bohlin GmbH, 10 Allemagne; système de mesure CP5/30: cône de 30 mm de diamètre, angle du cône par rapport au plateau de 5,4°, entrefer cône-plateau de 0,1 mm).

15 L'échantillon est ensuite soumis à un gradient de vitesse de cisaillement, opéré par la rotation continue du plateau, qui le force à s'écouler entre le cône et le plateau. En résistant contre la déformation, l'échantillon développe alors une force tangentielle appelée contrainte de cisaillement (shear stress). Cette contrainte qui est proportionnelle à la résistance à l'écoulement est mesurée par l'intermédiaire d'une barre de torsion montée sur le cône qui est sensible à une force de torsion. 20 La viscosité de l'échantillon est alors déterminée, pour une vitesse de cisaillement variant de 4,645 à 293,1 s⁻¹, par le rapport entre la contrainte de cisaillement (mPa) et la vitesse de cisaillement (s⁻¹).

25 Dans ces conditions, la souche *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 donne une viscosité au milieu de l'ordre de 30 mPa.s à une vitesse de cisaillement de 290 s⁻¹.

Pour comparaison, dans les mêmes conditions, les souches texturantes *Streptococcus thermophilus* CNCM I-1421, *Lactobacillus bulgaricus* CNCM I-1724, *Lactobacillus bulgaricus* CNCM I-800, *Lactobacillus bulgaricus* CNCM I-1198, mentionnées respectivement dans EP688864, EP638642, EP367918, EP564965, donnent une viscosité au milieu, respectivement, de l'ordre de 80, 100, 110 et 130 mPa.s à une vitesse de cisaillement de 290 s⁻¹. 30

Exemple 1

On mélange 3% d'une pré-culture fraîche dans un milieu MRS de la souche *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 à du milieu MSK stérile comprenant du lait écrémé en poudre reconstitué à 10%, 0,1% d'extrait de levure commerciale, 0,5% de peptone et 0,1 % de Tween 80, puis on le fermente pendant 8 heures à 40°C, sans brassage.

On prépare ensuite une culture à grande échelle de cette souche à partir d'un lait écrémé, pasteurisé à 88°C pendant 2 min, comprenant 0% de matière grasse et 9% de matière sèche. Pour cela, on inocule ce lait à 40°C avec 5% de la pré-culture décrite ci-dessus, 150 ppm de chlorure de calcium et 10 ppm de présure de veau. On le fermente jusqu'à pH de 4,5 (16 heures). Le lait se sépare alors en deux phases distinctes constitués d'un caillé et d'un lactosérum. Puis on centrifuge directement le lait caillé, à 40°C, à 8500 rpm (rotations par min) dans une centrifugeuse Westfalia® (Allemagne). On récupère finalement un caillé présentant 15,5% de matière sèche et environ 5×10^8 cfu/g. Le lactosérum contient environ 0,66% en poids de protéines.

Pour comparaison, on prépare traditionnellement un fromage frais, en fermentant à 23-27°C jusqu'à pH 4,4 le même lait écrémé, en présence de présure, avec deux souches commerciales de bactéries lactiques mésophiles. On chauffe le lait caillé à 60°C pendant 2 min, puis on le refroidit à 40°C. On centrifuge à 40°C et à 8500 rpm le lait caillé chauffé dans la centrifugeuse Westfalia®, et on récupère un caillé présentant 15,5% de matière sèche et moins de 10^3 cfu/g de bactéries vivantes.

Les résultats montrent que l'on peut préparer un caillé comprenant 5×10^8 cfu/g de bactéries lactiques thermophiles, sans perdre significativement de la matière protéique au cours de la centrifugation. En effet, le taux de matière sèche obtenu pour le fromage frais comparatif est identique à celui comprenant des bactéries thermophiles. Après refroidissement à 10°C, le caillé se présente sous la forme d'une pâte malléable, consommable à titre de fromage blanc maigre.

Exemple 2

- 5 Le fromage frais obtenu à l'exemple 1 est mélangé à 20% de yoghourt commercial LC1® (HIRZ®, Suisse) qui comprend la souche *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225, et 8% de crème de lait à 40% de matière grasse. On obtient une pâte malléable, consommable à titre de fromage blanc gras.

Exemple 3

- 10 On prépare un fromage frais comme décrit dans l'exemple 1, à la différence près que l'on fermente le lait avec les souches *Lactobacillus bulgaricus* YS4 et YL8 à texture courte, c'est à dire des souches qui lorsqu'elles fermentent un lait pasteurisé contenant 10% d'une poudre de lait écrémé, 1% d'extraits de levure et 0,5% de glucose, à 40°C jusqu'à pH 4,9, donnent une viscosité au milieu qui est
15 inférieur à 50 mPa.s à une vitesse de cisaillement de 290 s⁻¹.

Pour chaque fromage frais ainsi obtenu, les résultats sont similaires à ceux rencontrés à l'exemple 1.

Revendications

1. Procédé de préparation d'un fromage frais ayant une texture lisse et plus de 13% de matière sèche, dans lequel on fermente un lait par au moins une souche de bactérie lactique thermophile à texture courte jusqu'à atteindre un pH inférieur à 4,9 de sorte à obtenir un lait caillé, et on retire le lactosérum ainsi formé par centrifugation en continu à un débit supérieur à 500 l/h, le lait caillé n'étant jamais chauffé à plus de 50°C.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la bactérie lactique thermophile à texture courte est une bactérie qui, lorsqu'elle fermente un milieu adapté à sa croissance à un pH optimale pour la production d'une forte viscosité, donne une viscosité au milieu qui est inférieure à 50 mPa.s à une vitesse de cisaillement de 290 s⁻¹.
3. Procédé selon la revendication 2, dans lequel la bactérie lactique thermophile à texture courte est une bactérie qui, lorsqu'elle fermente un lait pasteurisé contenant 10% d'une poudre de lait écrémé, 1% d'extraits de levure et 0,5% de glucose, à 40°C jusqu'à pH 4,9, donne une viscosité au milieu qui est inférieure à 50 mPa.s à une vitesse de cisaillement de 290 s⁻¹.
4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel la bactérie lactique thermophile à texture courte est la souche *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225.
5. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le lait comprend 50-300 ppm de chlorure de calcium.
6. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le lait comprend 0,005 à 0,1% en volume/volume de présure.
7. Procédé selon la revendication 1, dans lequel, après avoir retiré le lactosérum par centrifugation, on mélange le caillé à 10-60% en poids d'un lait fermenté par des bactéries lactiques.
8. Procédé selon la revendication 1, dans lequel, après avoir retiré le lactosérum par centrifugation, on mélange le caillé à 0,1-15% en poids de crème de lait.

5 9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, dans lequel on fermente un lait écrémé par une bactérie lactique thermophile à texture courte à 35-47°C jusqu'à pH 4-4,9 et en présence de présure, et on sépare le lactosérum par centrifugation à 30-50°C.

10 10. Fromage frais non-affiné, susceptible d'être obtenu selon le procédé décrit à l'une des revendications 1 à 9, ayant une texture lisse, et contenant plus de 13% de matière sèche et 10^4 - 10^{10} cfu/g de bactéries lactiques thermophiles à texture courte, c'est à dire des bactéries qui, lorsqu'elles fermentent un lait pasteurisé contenant 10% d'une poudre de lait écrémé, 1% d'extraits de levure et 0,5% de glucose, à 40°C jusqu'à pH 4,9, donnent une viscosité au milieu qui est inférieure à 50 mPa.s à une vitesse de cisaillement de 290 s⁻¹.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/06947

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A23C19/032 A23C19/076

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHAH N ET AL: "RENNET EFFECTS AND PARTITIONING OF BACTERIAL CULTURES DURING QUARG CHEESE MANUFACTURE" JOURNAL OF FOOD SCIENCE, vol. 55, no. 2, 1 March 1990, pages 398-400, 454, XP000126290 cited in the application	1-3,6,8, 9
X	see page 398, column 2 - page 400, column 1 --- -/--	10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 April 1998

Date of mailing of the international search report

04/05/1998

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Desmedt, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/06947

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE FSTA INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE (IFIS), FRANKFURT/MAIN, DE AN=84-12-p2444, E. BOGDANOVA: "Acidophilus tvorog" XP002062103 see abstract & MOLOCHNAYA PROMYSHLENNOST , no. 11, 1983, pages 18-19,</p>	1-3,10
X	<p>US 4 434 184 A (M. KHARRAZI) 28 February 1984 see claims 1-6</p>	1-3,10
X	<p>EP 0 038 940 A (SOCIETE DES PRODUITS NESTLE) 4 November 1981 cited in the application see page 2, line 24 - page 5, line 27; examples 1,6</p>	1-3,6,10
X	<p>J. RASIC: "Yogurt and yogurt cheese manufacture" CULTURED DAIRY PRODUCTS JOURNAL, vol. 22, no. 4, 1987, pages 6-8, XP000671878 cited in the application see page 7, column 1 - page 8, column 1</p>	1-3,6,8, 10
X	<p>EP 0 617 899 A (SITIA-YOMO) 5 October 1994 cited in the application see page 3 - page 6; claims 1,2</p>	10
X	<p>V. WOLPERT: "Skyr and skyrwhey" MILK INDUSTRY , vol. 90, no. 3, 1988, page 29 XP002062102 cited in the application see the whole document</p>	10
A	<p>WO 95 14389 A (UNILEVER) 1 June 1995 cited in the application see page 2, line 15 - line 32</p>	1,6,9
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 91, no. 7, 1979 Columbus, Ohio, US; abstract no. 54929g, page 544; XP002030337 see abstract & PL 95 218 A (W. BEDNARSKI)</p>	7
	<p>4</p>	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/06947

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 578 302 A (D. BRASSART) 26 November 1996 see claims 1-3 -----	4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. .onal Application No

PCT/EP 97/06947

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4434184 A	28-02-84	NONE	
EP 38940 A	04-11-81	CH 643113 A AR 228597 A US 4362749 A	30-05-84 30-03-83 07-12-82
EP 617899 A	05-10-94	IT 1263848 B DE 69312469 D DE 69312469 T	04-09-96 28-08-97 06-11-97
WO 9514389 A	01-06-95	AU 1241395 A EP 0731644 A	13-06-95 18-09-96
US 5578302 A	26-11-96	EP 0577903 A AT 161181 T AU 4158893 A CA 2099855 A CZ 9301342 A DE 69223615 D DE 69223615 T FI 933001 A HU 66632 A JP 2672247 B JP 6098782 A NO 932407 A NZ 248056 A PL 299543 A SK 71193 A	12-01-94 15-01-98 13-01-94 07-01-94 19-01-94 29-01-98 09-04-98 07-01-94 28-12-94 05-11-97 12-04-94 07-01-94 28-08-95 21-02-94 08-06-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. Je Internationale No

PCT/EP 97/06947

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 A23C19/032 A23C19/076		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 A23C		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	SHAH N ET AL: "RENNET EFFECTS AND PARTITIONING OF BACTERIAL CULTURES DURING QUARG CHEESE MANUFACTURE" JOURNAL OF FOOD SCIENCE, vol. 55, no. 2, 1 mars 1990, pages 398-400, 454, XP000126290 . cité dans la demande	1-3, 6, 8, 9
X	voir page 398, colonne 2 - page 400, colonne 1 <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> --- -/-- </div>	10
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
* Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">14 avril 1998</div>	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">04/05/1998</div>	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Desmedt, G</div>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Doc. de Recherche Internationale No
PCT/EP 97/06947

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE FSTA INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE (IFIS), FRANFURT/MAIN, DE AN=84-12-p2444, E. BOGDANOVA: "Acidophilus tvorog" XP002062103 voir abrégé & MOLOCHNAYA PROMYSHLENNOST , no. 11, 1983, pages 18-19, ----	1-3,10
X	US 4 434 184 A (M. KHARRAZI) 28 février 1984 voir revendications 1-6 ----	1-3,10
X	EP 0 038 940 A (SOCIETE DES PRODUITS NESTLE) 4 novembre 1981 cité dans la demande voir page 2, ligne 24 - page 5, ligne 27; exemples 1,6 ----	1-3,6,10
X	J. RASIC: "Yogurt and yogurt cheese manufacture" CULTURED DAIRY PRODUCTS JOURNAL, vol. 22, no. 4, 1987, pages 6-8, XP000671878 cité dans la demande voir page 7, colonne 1 - page 8, colonne 1 ----	1-3,6,8, 10
X	EP 0 617 899 A (SITIA-YOMO) 5 octobre 1994 cité dans la demande voir page 3 - page 6; revendications 1,2 ----	10
X	V. WOLPERT: "Skyr and skyrwhey" MILK INDUSTRY , vol. 90, no. 3, 1988, page 29 XP002062102 cité dans la demande voir le document en entier ----	10
A	WO 95 14389 A (UNILEVER) 1 juin 1995 cité dans la demande voir page 2, ligne 15 - ligne 32 ----	1,6,9
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 91, no. 7, 1979 Columbus, Ohio, US; abstract no. 54929g, page 544; XP002030337 voir abrégé & PL 95 218 A (W. BEDNARSKI) ----	4

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De : de Internationale No
PCT/EP 97/06947

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 578 302 A (D. BRASSART) 26 novembre 1996 voir revendications 1-3 -----	4

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der. Je Internationale No

PCT/EP 97/06947

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 4434184 A	28-02-84	AUCUN	
EP 38940 A	04-11-81	CH 643113 A AR 228597 A US 4362749 A	30-05-84 30-03-83 07-12-82
EP 617899 A	05-10-94	IT 1263848 B DE 69312469 D DE 69312469 T	04-09-96 28-08-97 06-11-97
WO 9514389 A	01-06-95	AU 1241395 A EP 0731644 A	13-06-95 18-09-96
US 5578302 A	26-11-96	EP 0577903 A AT 161181 T AU 4158893 A CA 2099855 A CZ 9301342 A DE 69223615 D DE 69223615 T FI 933001 A HU 66632 A JP 2672247 B JP 6098782 A NO 932407 A NZ 248056 A PL 299543 A SK 71193 A	12-01-94 15-01-98 13-01-94 07-01-94 19-01-94 29-01-98 09-04-98 07-01-94 28-12-94 05-11-97 12-04-94 07-01-94 28-08-95 21-02-94 08-06-94

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.⁷

A23L 1/28

C12N 1/20

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00800008.5

[43] 公开日 2001 年 8 月 1 日

[11] 公开号 CN 1306400A

[22] 申请日 2000.1.21 [21] 申请号 00800008.5

[30] 优先权

[32] 1999.6.24 [33] JP [31] 178377/1999

[86] 国际申请 PCT/JP00/00294 2000.1.21

[87] 国际公布 WO01/00045 日 2001.1.4

[85] 进入国家阶段日期 2000.8.17

[71] 申请人 明治乳业株式会社

地址 日本东京都

共同申请人 若素制药株式会社

[72] 发明人 木村胜纪 平田晴久 古贺泰裕

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 马崇德 谭明胜

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图页数 1 页

[54] 发明名称 对幽门螺杆菌具有消毒作用的食物或饮料产品

[57] 摘要

一种对幽门螺杆菌具有高消毒作用和/或防止幽门螺杆菌感染的食物或饮料包 含对幽门螺杆菌具有高消毒能力的加氏乳杆菌 OLL2716(FERM BP -6999)作为有效成分。

使用乳酸菌制备的食物或饮料,如酸奶等,适于作为食物或饮料长期摄入,该 食物或饮料对幽门螺杆菌具有高消毒作用和/或防止幽门螺杆菌感染。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种对幽门螺杆菌具有消毒作用和/或防止幽门螺杆菌感染的食品或饮料产品，该食品或饮料产品包含至少一种对幽门螺杆菌具有高消毒能力的属于加氏乳杆菌的乳酸菌，含该乳酸菌的原料和其加工的产品。

2. 一种对幽门螺杆菌具有消毒作用和/或防止幽门螺杆菌感染的食品或饮品，该食品或饮料产品包含至少一种属于加氏乳杆菌的乳酸菌，该乳酸菌对幽门螺杆菌具有高消毒能力，耐受低 PH 环境以及当制备作为口服剂量组合物时具有高存活率，含该乳酸菌的原料和其加工的产品。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的食物或饮料产品，其中乳酸菌是加氏乳杆菌 OLL 2716。

4. 根据权利要求 1 至 3 任一权利要求所述的的食物或饮料产品，其中含乳酸菌的原料是至少选至以下物质中的一种：乳酸菌悬浮物，乳酸菌培养物，乳酸菌培养液，以及来自乳酸菌的发酵乳。

5. 根据权利要求 1 至 4 任一权利要求所述的的食物或饮料产品，其中该加工的产品是至少选至以下物质中的一种：浓缩产品，糊状产品，干品（至少一种选自喷雾干燥产品，冻干产品，真空干燥产品和转鼓干燥产品），液体产品以及稀释产品。

6. 根据权利要求 1 至 5 任一权利要求所述的的食物或饮料产品，其中食品或饮料产品是健康食品。

7. 加氏乳杆菌 OLL 2716 (FERM BP-6999)。

说明书

对幽门螺杆菌具有消毒作用的食物或饮料产品

本发明的详细描述

5 本发明所属技术领域

本发明涉及对幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, 本文有时下称 *H. pylori*) 具有消毒作用和/或防止幽门螺杆菌感染的加氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*, 本文有时下称 *L. gasseri*), 以及含该乳酸菌的食物或饮料产品。

10 现有技术

自从 1983 年瓦伦 (Warren) 等人发现幽门螺杆菌是作为在胃中存活的细菌以来 [Lancet, I. 1273 (1983)], 关注的重点放在其与慢性胃炎、胃溃疡和十二指肠溃疡之间的关系。最近已经证实: 受幽门螺杆菌感染的蒙古沙鼠在没有给予任何致癌物的情况下出现了胃腺癌 [Watanabe 等人, 胃肠病学 (Gastroenterology), 115; 642 (1988)], 而且幽门螺杆菌与胃癌的关系也已经被认为是作为一种病原细菌。

同时, 对患消化性溃疡和幽门螺杆菌呈阳性的病人进行幽门螺杆菌消毒能够抑制消化性溃疡的复发, 因此, 幽门螺杆菌的活性消毒疗法已在欧洲和美国运用。就幽门螺杆菌的消毒方法而论, 常用的有抗菌素 (β -内酰胺, 氨基糖苷, 大环内酯, 四环素类等) 和抗溃疡剂相组合的方法; 例如, 临床采用三种药物的结合治疗方法, 即两类抗菌素 (6-甲氧基红霉素-甲硝唑或阿莫西林) 加上一种抑制胃酸分泌的质子泵抑制剂 (proton pump inhibitor)。但是, 为消毒治疗目的而施用抗菌素之类的药物最严重的缺点是: 由于高剂量药物的多重组合, 增加了幽门螺杆菌抗药发生频率, 以及产生严重的副作用, 如腹泻和过敏等。

为了代替抗菌素达到在胃中对幽门螺杆菌消毒的目的, 已经检查试验过如下方法: 包括乳铁传递蛋白给药的方法 (JP-公开 130164/1998), 采用由脲酶和幽门螺杆菌鞭毛作为抗原对鸡进行免疫获得的特殊抗原的方法 (JP-公开 287585/1998), 包括采用特殊单一短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 菌株和/或唾液乳杆菌

(*Lactobacillus salivarius*) 菌株 (JP-公开 241173/1997) 和嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 菌株 (JP-公开 98782/1994) 的各种活细菌给药的方法, 这是作为使用乳酸菌的方法。然而, 没有令人满意的方法见诸报道。

- 5 另一方面, 由于乳酸菌可产生香味物质, 并能够产生象乳酸和细菌素一类的抗菌物质, 故乳酸菌是在世界范围内以发酵乳品等形式的传统食品中非常安全的微生物。因此, 可以说利用乳酸菌的抗菌作用对幽门螺杆菌消毒是简单而有效的方法, 同时没有副作用。

- 10 在现有发明中, 实现了对乳酸菌菌株的选择, 特别是短乳杆菌菌株和/或唾液乳杆菌 (JP-公开 241173/1997), 但这些发明不仅没考虑到作为幽门螺杆菌的目标场所的胃的环境特性 (要耐低 PH 环境), 而且没有注意到作为使用该乳酸菌菌株制备的食品如发酵乳品的性能 (乳酸菌菌株的存活率, 风味及物理特性)。此外, 一项报道说明临床试验所用的嗜酸乳酸菌是无效的 [Bazzoli 等人, 胃肠病学 (Gastroenterology), 102, No. 4, A38, (1992)]。再则, JP-公开 98782/1994 所述的嗜酸乳酸菌菌株培养物上清液显示了对幽门螺杆菌的消毒可能性, 但从未证明该作用可以得以保持 [Michetti 等人, 胃肠病学 (Gastroenterology), 108, No. 4, A166, (1995)]。如上所述, 为了制备适于消毒幽门螺杆菌的目标组合物, 现有的乳酸菌需要在很多方面进行改进。

20 本发明要解决的问题

- 25 在目前这种工业状况下, 要求针对抗胃炎和抗十二指肠病症建立一种消毒幽门螺杆菌和防止幽门螺杆菌感染的体系, 本发明人从安全和口服角度出发再次将注意力转向了乳酸菌, 并且已打算利用乳酸菌开发一种消毒幽门螺杆菌和防止幽门螺杆菌感染的体系。

- 30 更具体地说, 本发明要解决的问题是选择一种乳酸菌菌株, 该菌株在胃中具有高存活率和高繁殖特性, 在动物实验中具有明显的抗幽门螺杆菌活性和用于食品如发酵乳品中的显著性能 (乳酸菌菌株的成活率, 风味及物理特性), 以及利用该乳酸菌提供一种为消毒幽门螺杆菌和防止幽门螺杆菌感染的价廉且可每日摄取的新食品或饮料产品。

附图简要说明

图 1 显示了加氏乳杆菌 OLL2716 基因组 DNA 的 Apa I 消化模式 (脉冲场电泳)。

解决问题的手段

本发明的目的是解决上述问题。为了筛选所需的乳酸菌，本发明人设立了下述标准并尽努力进行筛选工作。更具体地说，本发明人已通过研究从人肠道派生的大量乳杆菌中筛选出具有以下性质的一种细菌菌株：1. 高耐胃酸性； 2. 在低 PH 条件下生长良好； 3. 对幽门螺杆菌附着到人体胃癌细胞 MKN45 具有高抑制能力； 4. 在混合物中进行幽门螺杆菌培养时具有对幽门螺杆菌生长的高抑制能力； 5. 对受幽门螺杆菌感染的试验鼠给药剂时，具有高消毒能力； 6. 当用于食品时，具有高存活率、良好的风味和物理特性。本发明人已发现加氏乳杆菌 OLL 2716 作为细菌菌株可以满足这些条件 (细菌菌株的保藏号是 FERM BP-6999， 保藏机构是国立生命科学和人体技术研究所， 通商产业省。该细菌菌株的细菌学特性如下：

1. 形态学特征

细胞形态：杆状菌

泳动度 (mobility)：无

存在或不存在孢子：不存在

革兰染色：阳性

2. 生理学特性 (阳性：+； 阴性：-； 弱阳性：W)

过氧化氢酶 -

产气 -

15℃ 生长 -

葡萄糖酸的吸收 -

25 乳酸的旋光性 DL

需氧生长 +

3. 碳水化合物的发酵性能 (阳性：+； 阴性：-； 弱阳性：W)

树胶醛糖 -

木糖 -

30 鼠李糖 -

核糖 -

葡萄糖 +

	甘露糖	+
	果糖	+
	半乳糖	+
	蔗糖	+
5	纤维二糖	+
	乳糖	+
	海藻糖	+
	密二糖	-
	密三糖	-
10	松三糖	-
	淀粉	W
	甘露醇	-
	山梨醇	-
	糊精	W

15 4. 遗传特征

DNA 中鸟嘌呤 (G) 和胞嘧啶 (C) 的含量是 36.4%。另外, 根据泰诺克 (Tannock) 等人的方法 [微生物生态健康分布 (Microbial. Ecol. Health Dis.), 8:79-84, 1995; 环境应用微生物学 (Appl. Environ. Microbiol), 62: 4608-4613]; 培养加氏乳杆菌 OLL 2716; 20 该细菌固定在琼脂糖栓 (plug) 上然后溶解; 基因组 DNA 用限制性核酸内切酶 (Apa I) 进行消化, 经过脉冲场凝胶电泳处理 (CHEF-DR II BIO-RAD) 重新获得图 1 所示的带形图案。该图中 A 表示加氏乳杆菌菌株 OLL 2716; B 表示尺寸标记。

5. 胃酸耐受性

25 胃酸耐受性实验按以下方式进行。即, 1 毫升 (ml) 加氏乳杆菌 OLL 2716 菌株的细菌悬浮液在 MRS 液体培养基 (DIFCO) 中经活化作用进行两次培养 (37℃, 18 小时), 用生理盐水清洗两遍, 该细菌悬浮液加入到 9ml 人造胃酸液中 [0.2%NaCl, 0.35%胃蛋白酶 (1:5000) 溶于蒸馏水中], 其 PH 为 2.0, 经过滤灭菌, 于 37℃ 下有氧接触 2 小时; 30 然后取 1ml 加入到 9ml、PH6.5 的磷酸盐缓冲溶液中 (67mM) 以终止反应。初始细菌数量和接触人造胃酸液后的细菌数量通过 MRS 琼脂计数来计算存活比例。在人体肠道派生出的乳杆菌 (150 种菌株)

中, 加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 的胃酸耐受性最强, 与其他细菌菌株的胃酸耐受性相比, 加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 的胃液耐受性最强(表 1)。

[表 1]

5 各种乳杆菌对人造胃酸液的耐受性

细菌菌株	经 2 小时处理后的存活率 (%)
加氏乳杆菌 OLL 2716	0.53
嗜酸乳杆菌 JCM 1132 T	0.48
鼠李糖乳杆菌 (<i>Lactobacillus rhamnosus</i>) GG (ATCC 53103)	0.018
唾液乳杆菌 WB 1004 (FERM P-15360)	0.004
短乳杆菌 WB 1005 (FERM P-15361)	0.18

6. 低 PH 值条件下的生长

10 10 微升 (μ l) 加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 在 MRS 液体培养基 (37℃, 18 小时) 中经活化作用进行两次培养, 该乳杆菌接种到改性的 MRS 液体培养基上 [0.2%NaCl, 0.35%胃蛋白酶 (1: 5000) 溶于 MRS 液体培养基中, 并将 PH 值调至 4.0], 在 37℃ 下进行需氧培养。从开始培养 9 小时后, 测量培养基的浊度 (OD_{650}) 作为生长程度。结果, 加氏乳杆菌 OLL 2716 在低 PH 值条件下的生长度最大 (表 2)。

[表 2]

各种乳杆菌在低 PH 值条件下的生长情况

细菌菌株	培养 9 小时后的 OD_{650}
加氏乳杆菌 OLL 2716	0.255
嗜酸乳杆菌 JCM 1132 T	0.030
鼠李糖乳杆菌 GG (ATCC 53103)	0.222
唾液乳杆菌 JCM 1231	0.116

15 7. 对人体胃癌细胞 (MKN 45) 的附着力

根据格拉纳托 (Granato) 等人的方法, 加氏乳杆菌 OLL 2716 和嗜酸乳杆菌 CNCM I-1225 对人体胃癌细胞 MKN 45 的附着力已作过测定 [环境应用微生物学 (*Appl. Environ. Microbiol.*), 65 (3),

1071-1077, (1999)], 格拉纳托等人测定了乳酸菌在人体大肠癌细胞上的附着力。采用 10ml 含 10%FCS 的 RPMI 1640 培养基 (RPMI, Nissui Pharmaceuticals), MKN 45 在 37℃ 下培养 3 天。经培养后, 该细胞被剥落并用 RPMI 冲洗, 再将其悬浮于 RPMI 中使得细胞最终浓
 5 度为 5×10^4 细胞/毫升 (cells/ml), 然后在 96-井 (池) 微量培养板中分成 0.1 毫升/井 (ml/well), 37℃ 下又培养 3 天后, 附着到微量培养板上的 MKN 45 用 0.1 M、PH 6 磷酸盐缓冲液冲洗以制备 MKN 45 单层。在 MRS 液体培养基 (DIFCO) 中培养后悬浮在 0.1 M、PH 6 磷酸盐缓冲液中使之达到 10^9 CFU/ml 的 0.1 ml 加氏乳杆菌 OLL
 10 2716 或嗜酸乳杆菌 CNCM I-1225 的悬浮液加入到该单层上; 形成的混合物在 37℃ 下培养 (恒温) 30 分钟。用 0.1 M、PH 6 磷酸盐缓冲液将 MKN 45 单层冲洗三遍; 将从未附着的乳酸菌除去。附着在 MKN 45 上的乳酸菌进行革兰染色并且通过显微镜计数。结果发现附着在 MKN 45 上的加氏乳杆菌 OLL 2716 的细菌数量比嗜酸乳杆菌 CNCM I-1225
 15 的细菌数量要大。换言之, 这证明了加氏乳杆菌 OLL 2716 具有对人体胃癌细胞的高附着力 (表 3)。

[表 3]

加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 对人体胃癌细胞的附着力

	每 100 个 MKN 45 细胞附着的细菌数量 (平均值±标准偏差)
加氏乳杆菌菌株 OLL 2716	560 ±55**
嗜酸乳杆菌 CNCM I-1225	234 ±30

** : $p < 0.01$ (Student 实验, $n=4$)

20 加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 被选择作为一种细菌菌株, 该菌株在人体胃环境中具有高的胃酸耐受性, 在低 Ph 值条件下生长良好, 通过以药剂 (抗胃炎剂, 抗溃疡剂) 或食品 (发酵乳品, 液体, 糊体, 干产品) 形式施用该细菌菌株的活细菌能够对幽门螺杆菌消毒并防止主体受幽门螺杆菌的感染, 从而防止胃炎、胃溃疡或十二指肠溃疡的
 25 发作或复发。因此, 加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 的抗幽门螺杆菌活性, 其酸牛奶产品性能 (货架寿命, 风味和物理特性), 以及受幽门螺杆菌感染的试验鼠给予药剂时加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 对幽门螺杆菌的消毒作用都将参照实施例作详细描述, 但本发明不受这些实施例的

限制。

更具体地说，本发明涉及对幽门螺杆菌具有消毒作用和/或防止受幽门螺杆菌感染的食品，该食品包含至少一种对幽门螺杆菌具有高消毒能力的属于加氏乳杆菌的乳酸菌，含该乳酸菌的原料和其加工的产品。

含该乳酸菌的原料包括乳酸菌的悬浮液；乳酸菌的培养物（包括该细菌，培养物上清液，培养基组分）；通过从乳酸菌培养物中丢弃固体而制备的乳酸菌培养液；乳酸菌发酵乳品，包括通过发酵乳酸菌制备的食品或饮品，如乳酸菌饮料、酸奶（acid milk）和酸牛奶（yogurt）等等。

加工产品包括乳酸菌浓缩物，含乳酸菌的原料，以及发酵乳；其糊状产品；干品（喷雾干燥产品，冻干产品，真空干燥产品，转鼓干燥产品等）；其液体产品；其稀释产品等。此外，活细菌、湿细菌和干细菌等都可适用作乳酸菌。

本发明的食品或饮品含有至少一种乳酸菌，含该菌的原料和其加工的产品作为有效成分，它可用作健康食品。

要混合的有效成分的量是任意的，可以根据其应用目的（预防、保健或治疗目的）适当地确定。合适的用量范围通常为 0.0001-10%。为健康和保健目的或为健康控制目的而长期服用时，该用量可能应低于上述范围；由于该有效成分从安全角度考虑不成问题，它绝对可以按上述用量范围使用。给老鼠喂食 10 天的准确毒性实验的结果证明：按 5000 毫克/公斤/天（mg/kg/day）的口服剂量没有发现死亡。

有效成分可直接用于食品或饮品，或者按常规方法与其它食物原料和食物成分适当地组合。使用该有效成分的本发明组合物可呈糊状、液体和悬浮物的任何形式，但该组合物优选通过使用在饮品生产中惯常使用的甜味剂、酸味剂、维生素和其它多种成分将该组合物制备成健康饮品。

根据本发明，加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 的活菌可通过例如发酵乳的形式而摄入，发酵乳主要包括酸牛奶（天然味酸牛奶（plain yogurt），水果酸牛奶，酸牛奶饮料，和冷冻酸牛奶），乳酸菌饮料，粉状食品，颗粒食品以及糊状食品等。当加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 用于制备上述发酵乳品时，该菌株在产品性能方面（货架寿命，风味，

物理性能) 特别优异。因此, 以发酵乳形式将加氏乳杆菌 OLL 2716 给药方法是最理想的。为了制备发酵乳, 采用以下菌与加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 一起作为发酵剂的方法是有效的: 乳杆菌属中的乳酸菌, 链球菌属 (*Streptococcus*), 明串珠菌属 (*Leuconostoc*), 足球菌属 (*Pediococcus*) 等, 长双歧杆菌属 (*Bifidobacterium longum*) 的双歧杆菌, 短杆菌 (*B. breve*), 婴儿双歧杆菌 (*B. Infantis*), 双歧杆菌 (*B. bifidum*) 等, 以及酵母等。另外, 制备发酵乳的加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 也可用于按制备原培养物, 扩大培养用发酵剂和生产用发酵剂这种顺序的方法中, 还可用作较大细菌量的浓缩发酵剂 (冷冻产品或冻干产品), 该发酵剂可直接接种成为生产用发酵剂或进行产品生产, 而不需要扩大培养用发酵剂的步骤。

试验例 1

根据卡比尔 (Kabir) 等人的方法 [Gut, 41(1); 49-55, (1997)], 幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 在人体胃癌细胞 (MKN45) 上的附着可由加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 得到抑制。

为了制备幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 带荧光标记的细菌溶液, 首先, 幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 在含 5%FCS (小牛胎儿血清) 的 Brucella 液体培养基中和稍有氧条件下经活化作用进行两次培养 (37℃, 72 小时), 然后将其用 PBS 冲洗并悬浮于一种细胞荧光标记工具 PKH-2 (Dai-Nippon Pharmaceuticals, Co) 的稀释液中使终浊度 (OD_{650}) 为 2.0。利用产气袋 Aneropack Helico (Mitsubishi Gas Chemicals, Co.) 进行稍有氧培养来培养该螺杆菌。向 1ml 该悬浮液中加入 50 μ l 荧光标记染料 PKH-2, 在室温下反应 15 分钟; 之后, 通过离心分离回收该细菌 (每分钟 3000 转 (rpm), 10 分钟 (min)), 用 Hank's 平衡盐水溶液 (HGS) 冲洗, 并悬浮于 1ml HGS 中; 形成的该溶液被指定为荧光标记细菌溶液。然后, 0.1ml 幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 的荧光标记细菌溶液 ($OD_{650}=2.0$) 和 0.1ml 加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 的细菌溶液 ($OD_{650}=4.0$) 同时加入到 0.8ml MKN45 的细胞悬浮液中 (1×10^6 cell/ml), 37℃ 下有氧震荡 1 小时。MKN45 的细胞悬浮液单用作空白样 (0.8ml MKN45 的细胞悬浮液+0.2ml HGS); 加有 HGS 的溶液代替加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 细菌溶液用作阴性对照样。经震荡后, 加入 9ml 含 15%蔗糖的 Dulbecco's PBS [细胞培养技

术第 6 版 (Cell Culture Technique (the six edition)), Asakura Shoten, pp. 20 (1991)], 该细胞通过离心分离 (1000rpm, 10min) 收集, HGS 冲洗, 再离心分离 (1000rpm, 10min); 然后将所得细胞再悬浮于 1ml HGS 中; 将 250 μ l 所得悬浮液加入到 96-井微量培养板中进行荧光化验; 其荧光强度 (激发波长: 490nm, 测量波长: 530nm) 用荧光板读出器测量。

假定幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 单独在胃癌细胞上的附着率定义为 100%, 那么在添加加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 的体系中幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 的附着率为 92.8%; 因此证明了该细菌菌株对幽门螺杆菌在胃癌细胞上的附着具有抑制作用。

试验例 2

在加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 抑制幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 生长的试验中, 幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 和加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 在活化作用下培养两次并分别接种在含 5%FCS 以及终菌落形成单位为 10^6 CFU/ml 和 10^5 CFU/ml 的 200 ml Brucella 液体培养基 (DIFCO) 中, 37℃ 下稍有氧培养。幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 和加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 的活菌数量从培养开始后 0, 24 和 48 小时进行计数。为了检测幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 和加氏乳杆菌菌株 OLL 2716, 分别采用如下的培养基和培养条件: 改性 Skirrow 培养基 [马血 (7%), BHI 琼脂 (52g) 三甲氧苄氨嘧啶 (5mg/l), 多粘菌素 B (2500 U/ml), 万古霉素 (10 mg/l), 杆菌肽 (5mg/l), 蒸馏水 (1000ml)] (37℃, 7 天, 稍有氧培养), 和 MRS 琼脂 (37℃, 48 小时, 有氧培养)。

结果, 幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 的活菌数量在其单独培养 48 小时后增加到约 5 倍, 但是在有加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 共存的情况下, 该活菌数量减少到约 1/10; 这证明了加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 具有抑制幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 生长的能力 (表 4)。

[表 4]

加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 对抑制幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 生长的作用

细菌菌株	0 小时	24 小时	48 小时
幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637	1.5×10^6	3.3×10^6	7.9×10^6
幽门螺杆菌生长率 (%)	100	220.0	526.7
加氏乳杆菌菌株 OLL 2716	2.2×10^5	7.4×10^7	4.5×10^7
幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637	1.9×10^6	1.2×10^6	1.8×10^5
幽门螺杆菌生长率 (%)	100	63.2	9.5

试验例 3

- 5 已经证明幽门螺杆菌能够在强酸条件下存活，因为幽门螺杆菌有能力降解脲和产生氨。为了测定加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 在脲存在时对幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 生长的抑制能力，检测了该菌株和嗜酸乳杆菌菌株 CNCM I-1225 在低 PH 值条件下对幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 生长的抑制作用。幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 和加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 或嗜酸乳杆菌菌株 CNCM I-1225 在活化作用下培养两次并分别接种在 200ml PH 为 4.0 的 Brucella 液体培养基中于 37 °C 下稍有氧培养，该培养基含有 5% FCS，5 mM 脲和终菌落形成单位分别为 10^5 CFU/ml 和 10^7 CFU/ml。幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 和加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 或嗜酸乳杆菌菌株 CNCM I-1225 的活菌数量从培养开始后 0，6 和 12 小时进行计数。

结果证明，在脲存在下经过 6 和 12 小时培养后，加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 对幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637 的抑制能力比嗜酸乳杆菌菌株 CNCM I-1225 要高。这亦证明了该细菌菌株即使在脲存在下仍对幽门螺杆菌生长具有高抑制力（表 5）。

[表 5]

在豚存在下，加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 对抑制幽门螺杆菌生长的作用

细菌菌株	0 小时	24 小时	48 小时
幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637	2.0×10^5	2.0×10^5	1.8×10^5
幽门螺杆菌生长率 (%)	100	100	90.0
加氏乳杆菌菌株 OLL 2716	1.5×10^7	4.0×10^7	1.2×10^8
幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637	2.0×10^5	1.5×10^5	3.0×10^4
幽门螺杆菌生长率 (%)	100	75.0	15.0
嗜酸乳杆菌菌株 CNCM I-1225	1.6×10^7	2.5×10^7	8.9×10^7
幽门螺杆菌菌株 NCTC 11637	2.0×10^5	1.9×10^5	1.0×10^5
幽门螺杆菌生长率 (%)	100	95.0	50.0

实施例 1

- 5 使用加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 制备天然味酸牛奶。更具体地，加氏乳杆菌菌株 OLL 2716，保加利亚乳杆菌 (*L. bulgaricus*) JCM 1002T 和嗜热酵母 (*S. thermophilus*) ATCC 19258 分别以 1% 的量接种到 10% 脱脂乳粉的培养基中，37℃ 培养 15 小时制备生产用发酵剂。在经过 95℃ 热处理 5 分钟的酸牛奶混合物 (SNF: 9.5%, FAT: 3.0%) 中接种 1% 保加利亚乳杆菌 JCM 1002T 和 1% 嗜热酵母 ATCC 19258 的发酵剂以及 5% 加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 的发酵剂；所得酸牛奶混合物在 43℃ 下发酵 4 小时。在发酵后立即冷却，之后，加氏乳杆菌菌株 OLL 2716，保加利亚乳杆菌 JCM 1002T 和嗜热酵母 ATCC 19258 的活菌数量分别为 9.0×10^7 CFU/ml， 6.4×10^7 CFU/ml， 11.0×10^8 CFU/ml，制出的酸牛奶具有良好的风味和物理性能。该酸奶在 10℃ 储存 2 周后，加氏乳杆菌菌株 OLL 2716，保加利亚乳杆菌 JCM 1002T 和嗜热酵母 ATCC 19258 的活菌数量分别为 3.7×10^7 CFU/ml， 2.7×10^7 CFU/ml， 10.8×10^8 CFU/ml，加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 的活菌数量只有很少降低。该储存产品的风味和物理性能俱佳。

20 对照例 1

使用唾液乳杆菌菌株 WB 1004 (FERM-15360) 制备天然味酸牛奶。更具体地说，采用与实施例 1 相同的步骤，其不同之处在于用唾液乳杆菌菌株 WB 1004 (FERM-15360) 代替加氏乳杆菌菌株 OLL

2716. 在发酵并冷却刚刚完成之后, 唾液乳杆菌菌株 WB 1004, 保加利亚乳杆菌 JCM 1002T 和嗜热酵母 ATCC 19258 的活菌数量分别为 5.3×10^7 CFU/ml, 6.0×10^7 CFU/ml, 12.5×10^8 CFU/ml, 制出的酸奶具有良好的风味和物理性能. 该酸牛奶在 10°C 储存 2 周后, 唾液乳杆菌菌株 WB 1004, 保加利亚乳杆菌 JCM 1002T 和嗜热酵母 ATCC 19258 的活菌数量分别为 0.1×10^7 CFU/ml, 4.5×10^7 CFU/ml, 8.8×10^8 CFU/ml, 唾液乳杆菌菌株 WB 1004 (FERM-15360) 的活菌数量减小到约 1/50.

实施例和对照例 1 的情况可总结为下表.

	储存	活菌数量 ($\times 10^7$ CFU/ml)		酸性 (%)	PH	风味
		OLL 2716	WB 1004			
实施例 1	储存前	9.0		0.90	4.42	优异
	2 周	3.7		1.11	4.07	良好
对照例 1	储存前		5.3	0.87	4.40	优异
	2 周		0.1	1.20	3.99	浓烈酸味

10 试验实施例 4

为了测定服用加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 或唾液乳杆菌菌株 WB 1004 (FERM-15360) 活菌在体内对幽门螺杆菌的消毒作用, 让无菌老鼠 (BALB/c) 感染幽门螺杆菌 NCTC 11637, 剂量为每只鼠 1×10^9 CFU; 四周后, 单独给这些受幽门螺杆菌感染的老鼠服用加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 和唾液乳杆菌菌株 WB 1004 (FERM-15360), 剂量为每只鼠 1×10^9 CFU, 第一周喂 3 次, 从第二周至第七周每周喂 1 次. 服用加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 或唾液乳杆菌菌株 WB 1004 (FERM-15360) 八周后, 老鼠胃中的幽门螺杆菌数量和加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 或唾液乳杆菌菌株 WB 1004 (FERM-15360) 数量分别在改性 Skirrow 培养基和 MRS 琼脂中进行计数, 而血清抗幽门螺杆菌抗体效价 (滴定值) (在 492 nm 处的吸收) 通过酶联和免疫吸收剂 (ELISA) 化验方法进行化验.

因此, 八周后对照组老鼠 (只服用幽门螺杆菌) 胃中的幽门螺杆菌数量被检测为 10^5 CFU/g, 而服用加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 和唾

液乳杆菌菌株 WB 1004 (FERM-15360) 活菌的老鼠其胃中的幽门螺杆菌数量被减低至可检出的极限值 (10^3 CFU/g 或更低)。但是, 与对照组老鼠相比, 服用加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 的老鼠其抗幽门螺杆菌抗体效价被降低至 1/5 或更低, 与服用唾液乳杆菌菌株 WB 1004 (FERM-15360) 的老鼠相比, 该效价仍降低至 1/4 或更低 (表 6)。因此, 证明了加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 对幽门螺杆菌的消毒作用比唾液乳杆菌菌株 WB 1004 (FERM-15360) 要高。另外还证明加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 在胃中有繁殖能力, 因为在服用加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 八周后老鼠中的该服用细菌菌株被检测为 10^6 CFU/g。

10 [表 6]

胃中乳杆菌的繁殖数量和对幽门螺杆菌 NCTC 11637 的消毒作用

老鼠	胃容器中细菌数量 (logCFU/g)			抗幽门螺杆菌抗体效价 A492
	唾液乳杆菌	加氏乳杆菌	幽门螺杆菌	
对照物 (N=5, 不服用乳酸菌)	未检测	未检测	5.2 ± 0.04	$0.488 \pm 0.284^*$
服用加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 (N=6)	未检测	6.1 ± 1.0	<3.0	$0.086 \pm 0.082^*$
服用唾液乳杆菌菌株 WB 1004 (FERM-15360) (N=5)	6.1 ± 0.8	未检测	<3.0	0.346 ± 0.276

*: $P < 0.05$ (谢夫实验 (Scheffe test))

试验例 5

15 为了证明加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 在人体中的功效, 给年龄在 40 至 60 岁的 30 个幽门螺杆菌呈阳性的人 (对象) 服用含加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 的酸奶。按照实施例 1 同样方法制备的 90 克 (g) 酸奶每天服用 2 次, 共 8 周。对幽门螺杆菌的作用通过豚呼吸试验, 血胃蛋白酶原 (I), 胃蛋白酶原 (II) 和内窥镜检查 (6 例)。

20 由此, 作为消毒幽门螺杆菌标记的血胃蛋白酶原 (I/II) 之比在 30 人中有 26 人得到改善; 在豚呼吸试验中, 发现 28 人中有 21 人

得到改进。另外，对参加内窥镜检查的 6 人作了胃细胞中的幽门螺杆菌数量计数；结果表明在所有 6 人中幽门螺杆菌的数量都减少到服用前的 1/10 至 1/100。

参考例 1

- 5 加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 接种到 5 升 (L) MRS 液体培养基 (DIFCO) 中，37℃ 静置培养 18 小时。培养结束后，该培养物在 7000 转/分 (rpm) 下离心分离 15 分钟，获得体积为液体培养物体积 1/50 的细菌浓缩物。该细菌浓缩物然后与等体积的含 10% 重量脱脂乳粉和 1% 重量谷氨酸钠的分散培养基混合，并将 PH 值调至 7，所得混合物随
10 后进行冻干。该冻干产物粉碎后过 60 目筛，得到冻干细菌粉。

参考例 2

- 根据第 13 次修订版《日本药典指南》的“通用药物制备规则中‘粉剂’的规定”，400g 乳糖 (根据 JP.) 和 600g 土豆淀粉 (根据 JP.) 加入到上述实施例所获得的 1g 加氏乳杆菌菌株 OLL 2716 的冻
15 干细菌粉中，并均匀混合制备成粉剂。

实施例 2

- 脱脂奶在 80℃ 至 85℃ 灭菌 20 至 30 分钟，然后均质、冷却。向所得均浆中加入 2% 至 5% 的细菌菌株 (FERM BP-6999) 的纯培养物作为发酵剂，37 至 40℃ 下发酵 16 小时得到乳酸含量为 2% 的酸奶 (在
20 一种脱脂乳的培养基中的一种培养物)。破坏所形成的凝块后，该酸奶冷却至 5℃，即为所指定的酸奶。

 另一方面，制备含有 15% 蔗糖和适量酸味剂，风味剂及染料的糖溶液，将其均质，70℃ 至 80℃ 灭菌 20 至 30 分钟，冷却至 5℃，即为所指定的糖溶液。

- 25 将所得的糖溶液和酸奶按 65: 35 的比例混合，制备出酸奶饮料。

实施例 3

- 40g 实施例 1 获得的在脱脂乳粉的培养基中的细菌菌株培养物的冻干产品中加入 40g 维生素 C 或 40 g 等量维生素 C 和柠檬酸的混合物，100g 砂糖，以及 60g 等量玉米淀粉和乳糖的混合物，然后充分混
30 合。该混合物装入包装袋中制备出 150 袋、每袋 1.5g 的粘稠型营养保健食品。

参考例 3

基于以下组合物制备一种抗溃疡剂：(1) 50g 脱脂乳粉的培养基中的细菌菌株培养物的冻干产品；(2) 90g 乳糖；(3) 29g 玉米淀粉；和(4) 1g 硬脂酸镁。

首先，将(1)，(2)和(3)（这里用 17g）混合，再与由(3)（这里用 7g）制备的糊状物一起造粒。向所得颗粒中加入(3)（这里用 7g）和(4)，所得混合物进行完全混合；该混合物再通过压片机制备成 100 片药片，每一药片含 40mg 活性组分。

本发明的优点

根据本发明，可以有效地实现对幽门螺杆菌的消毒和/或防止幽门螺杆菌感染，而且没有副作用。本发明的组合物绝对不存在安全性方面的问题，可以随意地以乳品和各种其他食品或饮品形式制备，因此，健康人以及小孩和婴儿，老人，虚弱者以及恢复期病人等都可长期摄取该组合物，该组合物可以提供特别优异的对胃炎和胃溃疡等病的预防和/或治疗作用。

15 根据细则第 13-2 条有关保藏微生物的情况

1. 加氏乳杆菌 OLL 2716

1) 微生物进行保藏的保藏机构名称及地址

名称：国际贸易和工业部，工业科技代理处，国家生命科学和人类技术研究所 (National Institute of Bioscience and Human-
20 Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry)

地址：1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan (〒 305-8566)

2) 在保藏机构的保藏日期

25 1999 年 5 月 24 日

3) 保藏时由保藏机构给予的保藏号

FERM BP-6999

00-08-17

说明书附图

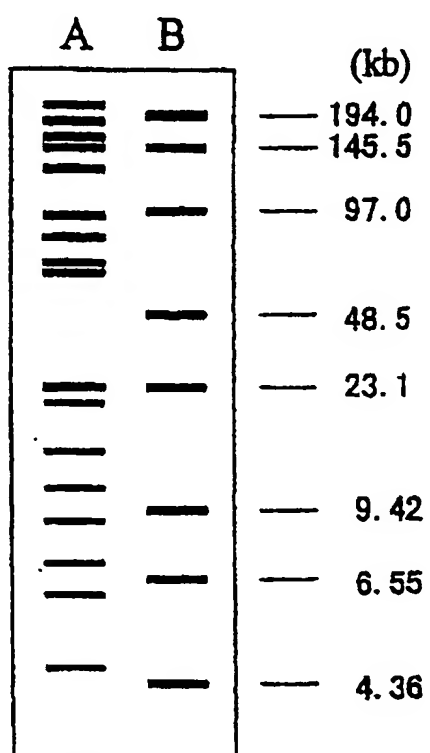


图 1